第38卷 第3期　　　　昆 虫 学 报　　　　Vol. 38, No. 3
1995年8月　　　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　　　Aug., 1995

# 二化螟对杀螟硫磷产生抗性的机理*

韩启发　庄佩君　唐振华
(中国科学院上海昆虫研究所　上海　200025)

**摘要**　本文就二化螟 *Chilo suppressalis* Walker 对杀螟硫磷抗性发生的机理进行了较为全面的研究。活体增效作用研究表明，脱叶磷（DEF）和氧化胡椒基丁醚（PBO）对抗性种群可分别增效 1.3 和 34.8 倍。这表明了多功能氧化酶（MFO）活性增强，而似乎与水解酶的活性无关。对离体解毒酶的进一步研究表明，抗性和敏感种群的非特异性酯酶活力无明显差异，但羧酸酯酶（CarE，加入 $10^{-4}$mol/L 的毒扁豆碱）和 MFO 的活力在抗性种群中有所增高。R 种群幼虫 CarE 活力分别是 S 的 2.42 和 2.92 倍（以 $\alpha$-和$\beta$-乙酸萘酯为底物）；R 种群幼虫 MFO 的 O-脱甲基作用的活力为 S 幼虫的 1.43 倍（以对硝基茴香醚为底物）；R 幼虫乙酰胆碱酯酶（AChE）对乙酰胆碱的活力是 S 的 1.3 倍，两者相差不大。但从米氏常数（$K_m$）和最大反应速度（$V_{max}$）看，R 幼虫是 S 幼虫的 1.7 和 1.6 倍；以对氧磷为抑制剂的 R 幼虫 $I_{50}$ 是 S 幼虫的 2 倍。这些表明了 R 和 S 的 AChE 是不同的。研究结果还表明，二化螟对杀螟硫磷抗性的机理至少包括：（1）CarE 活性的增高；（2）MFO 的 O-脱甲基活力的增高和（3）AChE 敏感性的降低等。

**关键词**　二化螟，杀螟硫磷，抗性机理

二化螟 *Chilo suppressalis* Walker 是我国长江流域及南方稻区的主要害虫，也是稻田化学防治的主要对象。日本、朝鲜及我国台湾地区已先后报道了二化螟对有机氯和有机磷发生了抗性[1-4]。国内对二化螟抗性的研究始于 80 年代中期，近年来日益受到重视。据王强等[5]和褚柏等[6]对江苏、四川和安徽等地区二化螟抗性的研究，均未发现有明显的抗性产生。在抗性形成的初期实施各种预防性治理策略将起到有效控制抗性发展的作用。但抗性风险的评估和抗性治理策略的研究都离不开抗性机理、特点（稳定性、交互抗性谱等）和抗性遗传等方面的研究[7]。目前国内外对二化螟的抗性研究大多集中于抗性监测，而对抗性机理尚未作进一步深入研究。本文以室内筛选获得的抗杀螟硫磷二化螟为对象，从活体和离体研究两方面着手，对其抗性产生的生化机理进行了较为详细的阐述，以期为二化螟抗性治理系统的研究提供理论依据。

## 1　材料和方法

### 1.1　供试材料

**1.1.1**　虫源：将采集于上海宝山县水稻田的二化螟卵块携回室内饲养，稳定后将该种群分

* 本研究为国家"八五"攻关课题中的部分内容。
本文于 1993 年 12 月收到。

为两部分，一部分以单卵块选育法选择敏感品系(S)。其方法是每一代将对杀螟硫磷敏感性高的卵块作为亲本保留，产卵繁殖后代。另一部分则在 3 龄幼虫阶段以 $LC_{70}$ 的杀螟硫磷用浸渍法逐代汰选。连续选择 7 代后，其抗性上升了 14 倍，作为供试抗性品系 (R)。

**1.1.2** 杀虫剂及试剂：97.5% 杀螟硫磷系德国 Bayer 公司产品；99% 对氧磷为英国 ICI 公司产品；氧化胡椒基丁醚 (PBO) 为英国 Kock-Light 实验室提供；99% S,-S,-S-三丁基三-(硫代磷酸酯)(脱叶磷，DEF) 由美国 Mobay 公司农业化学部提供；α-和 β-醋酸萘酯 (α-NA、β-NA) 为上海分析试剂厂产品；毒扁豆碱为德国 Fluka 公司产品；99% 碘化硫代乙酰胆碱 (ATCh) 和 98% 5,5'-二硫-双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 均为 Carl Roth 产品；NADPH 和 Triton X-100 为 Sigma 公司产品。其它均为分析纯或化学纯试剂。

## 1.2 实验方法

**1.2.1** 毒力测定：参照 FAO[8] 推荐的点滴法。将 1μl 杀虫剂的丙酮液点滴于 6 龄幼虫的中胸背板，于 26℃、16h 光照条件下恢复 48h 后检查死亡率。活体增效作用测定是先点滴一定量的增效剂 (10μg/头)，1h 后再点滴杀虫剂[9]。用 Finney 的机率值分析法编制的软件进行结果统计分析，求出毒力回归线、$LD_{50}$ 和卡方值 ($\chi^2$) 等。

**1.2.2** 酯酶和羧酸酯酶活性测定：将幼虫置于 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH = 7.0) 中匀浆，然后以 14000r/min 离心 15min，取上清液作酶源。活性测定方法参照 Van Asperen[10] 的方法。由于乙酰胆碱酯酶 (AChE) 对 α-NA 和 β-NA 都有水解作用，此时测得的酯酶活性本文称为非特异性酯酶或统称酯酶活性，而加了 AChE 的抑制剂毒扁豆碱 ($10^{-4}$mol/L) 后所测得的酯酶活性称羧酸酯酶 (CarE) 活性。

**1.2.3** 多功能氧化酶 (MFO) O-脱甲基作用：参照 Hansen 和 Hodgson[11] 的方法。以对硝基茴香醚 (p-NA) 为底物，3ml 反应混合液中包括 0.5 mmol/L NADPH、7.5 mmol/L $MgSO_4$、0.05mol/L Tris 缓冲液 (pH7.9)、1.5% 牛血清蛋白、2.0μmol/L p-NA 和 1 ml 酶液。于 30℃ 恒温振荡反应 30min，用 1mol/L HCl 中止反应。然后加入等量的氯仿 (5ml) 摇匀抽提，吸取 3ml 的氯仿层与 3ml 0.5mol/L NaOH 摇匀、抽提。在 Beckman DU-65 分光光度计上读出 NaOH 层(含产物对硝基苯酚)在 412nm 处的光吸收值。

**1.2.4** AChE 活性和动力学性质研究：将幼虫置于含 0.5% Triton X-100 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.5) 匀浆，于 14000r/min 离心 20min，取上清液作酶源，活性及对氧磷抑制中浓度 ($I_{50}$) 的测定参照唐振华等[12] 的方法。用 Lineweaver-Burk 作图法求出 $K_m$ 和 $V_{max}$ 值。

**1.2.5** 蛋白测定：用 Lowry[13] 的方法。

# 2 结果与讨论

## 2.1 活体增效作用测定

采自上海宝山县的二化螟野外种群经连续 7 代的选育后，R 和 S 品系对杀螟硫磷的的 $LD_{50}$ 分别为 109.07 和 7.72μg/g 体重，抗性指数达 14.1 倍(表 1)。R 品系毒力回归线的斜率 (b 值)为 1.79，表明该抗性品系杂合性较高，尚未达到纯合子抗性阶段。用水解酶

和 MFO 酶的抑制剂 DEF 和 PBO 进行活体增效作用的测定，其结果表明 DEF 对R品系几乎不表现增效作用(增效比为 1.3)，而 PBO 则有较强的增效作用，增效比达 34.8 倍。这一结果揭示了 MFO 可能参与了二化螟对杀螟硫磷抗性的形成，而与水解酯酶的关系不大。但由于未对这两种增效剂对 S 品系的增效作用作更多的研究，因此这一结论有待离体解毒酶活性的研究。

表 1 抗性和敏感品系对杀螟硫磷的 $LD_{50}$ 及 DEF 和 PBO 对抗性品系的增效作用

| 药剂和增效剂 | $LD_{50}$* | 毒力回归线 | 抗性指数 | 增效比** |
|---|---|---|---|---|
| 杀螟硫磷(S) | 7.72 | $Y = 7.8290 + 2.0981X$ | 1.0 | — |
| 杀螟硫磷(R) | 109.87 | $Y = 5.3427 + 1.7941X$ | 14.1 | — |
| 杀螟硫磷+DEF | 81.06 | $Y = 5.2487 + 0.7774X$ | — | 1.3 |
| 杀螟硫磷+PBO | 3.13 | $Y = 5.9268 + 0.5346X$ | — | 34.8 |

* μg/g 本重； ** R 品系 $LD_{50}$/加增效剂后 $LD_{50}$。

## 2.2 离体解毒酶活性的研究

2.2.1 非特异性酯酶和 CarE 活性：以 α-NA 和 β-NA 为底物分别测定了R和S幼虫中非特异性酯酶和 CarE 的活力，其结果见表 2。结果表明，同一品系对不同底物的

表 2 R 和 S 幼虫的非特异性酯酶、CarE 和 MFO 的活力

| 酶 | 酶活力 nmol/(mg 蛋白 · min) | | 相对倍数 |
|---|---|---|---|
| | R | S | (R/S) |
| 酯酶: | | | |
| α-乙酸萘酯 | 0.157±0.015* | 0.115±0.005 | 1.37 |
| β-乙酸萘酯 | 0.168±0.025 | 0.101±0.015 | 1.66 |
| CarE: | | | |
| α-乙酸萘酯 | 0.130±0 | 0.062±0.004 | 2.42 |
| β-乙酸萘酯 | 0.132±0.018 | 0.052±0.020 | 2.92 |
| MFO | 0.240±0.080 | 0.168±0.015 | 1.43 |

* 结果为 3 次实验的平均值，以下同.

总酯酶活性差异不大，但在不同品系中的表现却存在差异。对于R幼虫，以 α-NA 为底物的酯酶活性低于以 β-NA 为底物的活性，而对于S幼虫，以 α-NA 为底物的活性则高于以 β-NA 为底物的活性。就同一底物来说，R幼虫的酯酶活性略高于S幼虫。加入毒扁豆碱抑制后测得的 CarE 活性其变化趋势与总酯酶活性变化的趋势一致，且不论何种底物，R幼虫的 CarE 活性都明显高于S幼虫，差异达 2.5 倍。这些差异表明R幼虫的酯酶同功酶发生了变化，也可能正是这一变化导致了 DEF 的活体增效作用不明显，即与抗性有关的酯酶同功酶对 DEF 不敏感，因而不表现增效作用[14]。由此可见，在根据活体增效作用的结果进行推测时需要特别谨慎，当某种增效剂不能阻断某个代谢途径，因而不表现增效作用时，并不能完全排除该代谢途径参与抗性形成的可能性。由上述的结果可以推断，二化螟对杀螟硫磷抗性的产生，羧酸酯酶似乎参与了这一过程，其活性的增高是抗性产生的机理之一。

2.2.2 MFO 的 O-脱甲基作用：O-脱甲基作用是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂代谢的

一个重要步骤。以 p-NA 为底物(它在 MFO 的作用下可脱去 O-甲基生成对硝基苯酚)测定了R 和 S 幼虫的 MFO 活力。表 2 的结果表明，R 幼虫的 MFO 活性是 S 幼虫的 1.43 倍，这与活体增效作用的结果是一致的。但离体 MFO 活性的差异不及活体增效作用明显，这可能与 MFO 的作用方式广谱有关，O-脱甲基作用仅仅是其作用之一。总之,二化螟对杀螟硫磷的抗性与 MFO 的活性增高有关。

2.2.3 靶标酶——AChE 的研究：表 3 列出了R 和 S 品系幼虫的 AChE 活力、米氏常数 ($K_m$)、最大反应速度 ($V_{max}$) 和对氧磷的抑制中浓度 ($I_{50}$)。结果表明R 和 S 幼虫的 AChE 活力虽存在一定的差异，但并不显著。R 幼虫 AChE 活力仅是 S 幼虫的 1.3 倍；R 幼虫 AChE 的 $K_m$ 是 S 幼虫的 1.7 倍。可见R 和 S 幼虫的 AChE 有着质的不同。R 幼虫的 $I_{50}$ 是 S 幼虫的 2 倍,从而进一步证实了R 和 S 幼虫 AChE 存在质的差异。

表 3　R 和 S 幼虫 AChE 的活力、$V_{max}$ 和 $K_m$ 值及对氧磷的 $I_{50}$

| | R | S | R/S |
|---|---|---|---|
| AChE 活力* | 741.28±36 | 584.07±42 | 1.3 |
| $K_m$(mol/L) | $2.86\times10^{-5}$±0.81 | $1.66\times10^{-5}$±0.44 | 1.7 |
| $V_{max}^*$ | 42.60±4.50 | 25.90±7.60 | 1.6 |
| $I_{50}$(mol/L) | $4.36\times10^{-7}$±1.10 | $2.23\times10^{-7}$±0.60 | 2.0 |

* nmol/(mg 蛋白 · min)。

众所周知，有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂主要的中毒机理是抑制 AChE，从而破坏了突触间的神经传导。抗性昆虫有可能使 AChE 产生变构，降低与有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的亲和力，从而表现出敏感度降低。Hama[15] 认为变构的 AChE 与正常的 AChE 的 $K_m$ 值相差甚小,一般是在 2 倍以内,且变构的 AChE 且具有特殊的底物特异性。变构的 AChE 与正常的 AChE 对以 ATCh 为底物的活性方式是存在明显差异的。变构 AChE 对碘化丙酰胆碱 (PrTCh) 的活性较正常 AChE 高，而且无论是哪一种底物当其浓度达 $10^{-3}$mol/L 以上时,正常 AChE 会产生底物抑制现象，变构 AChE 在测定的底物浓度下则不存在底物抑制现象。唐振华等[12]对抗性小菜蛾 AChE 的研究也得到了类似的结果。抗性小菜蛾幼虫 AChE 没有底物抑制现象，对 ATCh 的活力不仅比 S 幼虫低一倍多,其 $K_m$ 值要比 S 幼虫高 100 多倍。据此他们认为，小菜蛾 AChE 的变构不仅涉及与抑制剂结合的有关氨基酸残基，而且涉及参与底物结合和催化的残基。根据本文的研究,抗性二化螟幼虫 AChE 的 $K_m$ 值是 S 幼虫的 1.7 倍，且R 幼虫的对氧磷抑制的 $I_{50}$ 是 S 幼虫的 2 倍，这充分说明R 幼虫 AChE 对抑制剂的敏感度有所降低。由于R 幼虫对杀螟硫磷的抗性仅为 14.1 倍,该品系尚属杂合子状态 (b 值也仅为 1.79)，故 AChE敏感度仅表现出有所降低,估计随着选择压的增大会表现更为明显。无疑抗性二化螟中存在变构的 AChE，但R 幼虫的变构 AChE 的底物特异性以及R 和 S 幼虫 AChE 在遗传上是否同源关系等，有待进一步深入研究。

综上所述，二化螟对杀螟硫磷抗性的发生与以下几个方面有关：(1) 羧酸酯酶活性的增强；(2) MFO 活性增高和 O-脱甲基活力的增强；(3) 乙酰胆碱酯酶敏感度的降低。由此可见,二化螟对杀螟硫磷的抗性是多因子的,至于是否涉及其它解毒酶系，如谷

胱甘肽转移酶等，或表皮穿透作用等方面相关尚不明确，有待于继续研究。

## 参　考　文　献

1 上住泰，杉浦哲也，森岗宽治．奈良县のニカメイチュウBHC抵抗性について．关西病虫害研究会报1970，12：88—90．

2 永田彻，林晃史．杀虫剂抵抗性の历史、现状および对策．见：药剂抵抗性，ソフトサイエンス社，1983，9—52．

3 石仓秀次．ニカメイチュウの药剂防除．植物防疫，1958，12(6)：269—272．

4 石仓秀次．近后最の害虫防除の进步．农业及园艺，1962，37(11)：1597—1760．

5 王强，谭福杰，尤子平．二化螟对六类杀虫剂的耐药性及增效剂的增效作用研究．南京农业大学学报(增刊)，1987，4：44—55．

6 褚柏，苏建坤，朱锦清．扬州地区水稻二化螟抗药性研究．南京农业大学学报(增刊)，1987，4：56—64．

7 Keiding, J. Prediction of resistance risk assessment, In: Pesticide Resistance; Strategies and Tactics for management. National Academy of Sciences, Washington, D. C., 1986, 279—297.

8 FAO. Approved test method 3; larvae of rice stem borer, In:Recommended Methods for Measurement of Pest Resistance to Pesticides. FAO plant protection paper. 1980, 25—28.

9 唐振华，等．杀虫剂混用的毒力测定．昆虫知识，1980，7(3)：136．

10 Van Asperen K. A study of housefly esterases by meanes of a sensitive colorimetric method. J. Insect Physiol. 1962, 8:1—16.

11 Hansen L G, Hodgson E. Biochemical characterristics of insect microsomes:N-and O-demethylation. Biochem. Pharma. 1971, 20:1569—78.

12 唐振华，周成理．抗性小菜蛾的乙酰胆碱酯酶敏感性．昆虫学报，1992，35(4)：385—392．

13 Lowry O H, *et al.* Protein measurement with the folin phenol regent. J. Biol. Chem. 1951, 193: 265.

14 Scott J G. Investigating mechanisms of insecticide resistance:methods, strategies, and pitfalls. In: B. E. Tabashnik, R. T. Roush (eds.) Pesticide Resistance. Chapman and Hall, New York and London. 1990, 39—57.

15 Hama H. Resistance to insectides due to reduced sensitivity of acetylcholinesterase, In G. P. Georghiou, T. Saito (eds.), Pest Resistance to Pestiside. Plenum Press, New York. 1983, 299—331.

# THE MECHANISM OF RESISTANCE TO FENITROTHION IN THE RICE STEM BORER *CHILO SUPPRESSALIS* WALKER

Han Qifa　　Zhuang Peijun　　Tang Zhenhua

(*Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica　Shanghai*　200025)

**Abstract**　The mechanism of resistance to fenitrothion in the rice stem borer *Chilo suppressalis* Walker is comprehensively investigated. Resistant strain (R), initiated from a field population, was selected successively by fenitrothion to the 7th generation and the resistant ratio was 14.1 as compared with that of the susceptible strain (S), which was obtained by selection with single-egg mass method. Synergism experiments showed that the synergistic ratio of DEF and PBO to fenitrothion in R strain were 1.3X and 34.8X, respectively. It suggested that resistance to fenitrothion was partially associated with multiple function oxidase (MFO). Furthermore, the activities of non-specific esterase, carboxylesterase (CarE) and MFO were determined *in vitro*. The results indicated that the activities of non-specific esterase in R and S strains showed no significant difference when using substrates of $\alpha$-naphthyl acetate and $\beta$-naphthyl acetate. But there was difference in the activity to CarE between R and S strains. The activities of CarE from the larvae of R strain with above-mentioned substrates (with $10^{-4}$ esterin) were 2.42-and 2.92-fold higher than that of S strain, respectively. The ratio of 0-demethylation activities of MFO extracts from R strain to that of S strain was found to be 1.43. The acetylcholinesterase (AChE) activities and the kinetic parameter, $K_m$ and $I_{50}$ of paraoxon were also measured. The ratios of activities, $K_m$ and $I_{50}$ of R strain to that of S strain were 1.6, 1.7 and 2.0, respectively. It was apparant that the AchE in R strain have altered.

From the results obtained, it is concluded that the onset of resistance to fenitrothion in the rice stem borer is due to multi-factor including high activities of CarE, MFO, enhanced O-demethylation of MFO and insensitivities of AChE.

**Key words**　*Chilo suppressalis*, fenitrothion., resistant mechanism